

RESEARCH ARTICLE

흰목이 균사체 배양 적합 조건 설정

이은지¹, 박혜성¹, 이찬중¹, 공원식¹, 구창덕^{2*} ¹국립원예특작과학원 버섯과, ²충북대학교 산림학과Suitable Conditions for Mycelial Culture of *Tremella fuciformis*Eun-ji Lee¹, Hye-Sung Park¹, Chan-Jung Lee¹, Won-Sik Kong¹, Chang-Duck Koo^{2*} ¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumsung 27709, Korea²Department of Forestry Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea*Corresponding author : koocdm@chungbuk.ac.kr

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the optimum culture conditions, for mass production of *Tremella fuciformis* in M9 basic medium. The strain KMCC04674, used in this study was identified *T. fuciformis* by internal transcribed spacer (ITS). To define the optimum conditions for the mass production of *T. fuciformis*, we investigated the effects of different culture conditions and various nutrient sources on the fungal growth. The optimum initial pH and temperature for the fungal growth were 5.0 and 25°C, respectively. The optimal composition of the growth medium was 4.0% mannitol, 3.0% NH₄H₂PO₄, 1.0% malt extract, 1.0% glutamic acid, 5mM CaCl₂, and 0.5% gluconic acid.

Keywords: Mass culture conditions, Mycelial growth, *Tremella fuciformis*

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2019 March, 47(1): 1-12
<https://doi.org/10.4489/KJM.20190001>Chang-Duck Koo
<https://orcid.org/0000-0001-9508-8858>**Received:** January 30, 2019**Revised:** March 6, 2019**Accepted:** March 8, 2019

© 2019 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

흰목이(*Tremella fuciformis*)는 흰목이목, 흰목이과, 흰목이속으로 열대 지방, 온대 및 추운 지역에도 분포하지만, 주로 아열대 지역에 분포하는 호기성 담자균류이다[5]. 흰목이는 6월과 7월 장마철에 활엽수 잡목지대와 고사목에서 반투명한 젤리형태를 가진 하얀색 수국꽃 모양으로 자란다[2]. 이 버섯균은 균사체와 자실체로 구분되며 담자포자에서 발아된 균사체가 영양기관이 되어 단핵균사와 자실체를 형성하는 이핵균사형태로 존재한다[3]. 이 균의 단핵균사는 다른 핵형의 포자에서 발아한 균사체와 결합을 하는 전형적인 4극성이며[4], 이핵균사체는 공생균(*Annulohyphoxylon stygium*)의 도움하에 자실체를 형성한다[3]. 흰목이는 셀룰로오스와 리그닌을 거의 분해하지 못하므로, 공생균이 리그닌과 셀룰로오스를 이용가능한 형태로 변형하면 흰목이는 자실체 성장발육에 필요한 영양소를 얻게된다[4, 10].

흰목이는 중국의 전통적인 귀한 식용 버섯이며 유명한 "진미" 중 하나이며, 약간의 단맛이 있으면

서 독이 없으며, 만성 기관지염, 폐 심장 질환, 산후 조리, 변비, 천식에 대한 효과가 있다[11]. 또한 이 버섯은 다당류의 함량이 많아 신체의 면역 기능을 향상하고, 노화를 지연하고, 종양을 억제하며[11], 다이어트에 효과가 있으며 콜레스테롤 증가를 억제한다[2,12].

흰목이의 첫 재배는 1864년으로 기록되었다[4]. 1940년도 이전에는 재배에 사용하고자 하는 원목을 자실체가 있는 원목 옆에 둬으로써 자실체에서 비산되는 포자가 원목에 떨어져 접종되는 단순한 방법에 의해 접종이 이루어져, 생산주기가 길고 생산량이 낮고 불안정하였다[5]. 1940년도에 Y. Xinmei 교수가 중국내 처음으로 흰목이 자실체에서 담포자를 분리하여 효모형 분생포자를 얻어서 포자 현탁액을 만들었으며, 1968년 푸젠, 광둥 그리고 후베이에서 혼합 배양 종균을 사용하여 대규모의 원목 인공 재배가 시작되었고, 1974년 Gutian 지방의 S. S. Yau가 흰목이 병재배 방법을 개선하였으며, 같은 지방의 W. H. Dairk도 단위 면적당 수량이 매우 높은 봉지 재배의 방법을 발전시켰다[5]. 현재 중국에서 흰목이의 생산 지역은 주로 쓰촨성 통강과 복건에 집중되어 있으며, 재배 기술 발전으로 흰목이를 대량생산하고 있다[5]. 흰목이의 재배방법은 다른 버섯에 비해 다소 까다로우며, 공생균을 활용하는 특수한 재배기술이 필요하다. 그러나 현재 국내에서는 일부농가에서 중국의 흰목이 재배기술을 습득하여 재배하고 있지만 대량생산을 위한 재배기술의 불안정으로 실패와 낮은 생산량으로 어려움을 겪고 있다. 따라서 본 연구에서는 흰목이의 안정적인 대량생산을 위해 필수적인 균사의 최적배양조건을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주 및 배양배지

본 시험에서는 ITS 염기서열 분석으로 흰목이로 확인된 KMCC04674(Table 1) 균주를 사용하였다. 기본 배지는 PDB(Potato Dextrose Broth 24g)배지와 M9배지(Na₂HPO₄ 6.6g, KH₂PO₄ 3.34g, NaCl 0.56g, NH₄Cl 1.12g, MgSO₄ 0.56g, CaCl₂ 0.012g)[8]를 이용하여 실험하였다. 실험균주는 멸균증류수 튜브에 옮겨 상온에 보관하면서 실험에 사용하였다.

DNA 분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열의 결정

DNA는 Quiagen Genomic DNA Isolation Kit(Quiagen, USA)을 사용하여 분리하였고, PCR 증폭은 15 ng의 genomic DNA, 각 0.5 pmol의 primer, 200 μM dNTP, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂에 증류수를 첨가하여 최종 volume을 30 μl로 하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 2분간 실시하고, denaturation 40초(94°C), annealing 1분(58°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycle을 반응시키고 마지막으로 72°C에서 5분간 incubation 하였다. rDNA의 ITS 영역은 ITS 1과 ITS 4 primer[17]를 이용하여 증폭하였다. PCR 산물은 Wizard PCR prep kit(Promega, Madison,

Table1. *Tremella fuciformis* used in this study

KMCC strain no	Location of collection sites	Year
04674	Jinju-si, Gyeongsangnam-do	2017

KMCC: Korean Mushroom Culture Collection, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea

WI, USA)으로 정제하고, sequencing 반응은 BigDye terminator cycle sequencing kits(Applied Biosystems, Forster City, CA, USA)를 이용, template 40 ng, primer 3.2 pmol, Terminator ready reaction mixture 8 μ l에 물을 첨가하여 20 μ l의 volume으로 조절한 뒤 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 25 cycle의 PCR 반응을 수행하였다. 반응에는 각각의 PCR 반응에 사용한 동일한 primer를 사용하였다. Gel 전개 및 염기서열 분석에는 ABI Prism 3100 Genetic analyzer(PE Applied Biosystem)를 이용하였다. 종 유사성 결정을 위해 Clustral W 분석프로그램[16]을 사용하여 GenBank에 있는 다른 염기서열들과 비교하였다. Jukes와 Cantor[6] 방법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하고, MEGA의 Neighbor-joining[7, 14] 방법을 이용하여 계통수를 작성하였으며, tree의 안정성은 1000 반복의 bootstrap 분석으로 조사하였다.

균사배양적은 선발

흰목이의 균사생장에 적합한 최적 온도를 구명하기 위하여 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지에서 14일간 배양된 흰목이 균사체를 살균 증류수 100ml와 혼합한 후[13], PDB배지 9ml가 든 테스트튜브 상에 5반복씩 1ml 접종하였다. 15°C에서 35°C까지 5°C 간격으로 조정된 진탕배양기(180 rpm)에서 7일간 암배양한 후 10배 희석법을 이용하여 10^5 배로 희석한 배양액 100 μ l를 PDA 평판배지상에 도말한 후, 25°C 항온배양기에서 7일간 배양하여 균총숫자를 집계하여 colony forming unit(CFU)/mL으로 나타내었다[8].

균사배양 적합 초기 pH 선발

초기 pH에 따른 흰목이의 생육정도를 조사하기 위하여 PDA 평판배지에서 14일간 배양된 흰목이 균사체를 살균 증류수 100ml와 혼합한 후, 1N NaOH와 1N HCl 그리고 인산완충용액을 이용하여 pH 3.0에서 pH 11까지 pH 1.0 간격으로 조정된 PDB 액체배지 9ml가 담긴 테스트튜브 상에 5반복씩 1ml 접종하였다. 접종한 균체를 진탕배양기(180 rpm)에서 7일간 암배양한 후 10배 희석법을 이용하여 10^5 배로 희석한 배양액 100 μ l를 PDA 평판배지상에 도말한 후, 25°C 항온배양기에서 7일간 배양하여 균총숫자를 집계하여 colony forming unit(CFU)/mL으로 나타내었다.

균사배양 적합 영양원 선발

흰목이의 최적 양분조건을 조사하기 위하여, PDA 평판배지에서 14일간 배양된 흰목이 균사체를 살균 증류수 100ml와 혼합한 후, M9배지에 탄소원은 fructose 등 21종, 무기질소원은 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 등 7종, 유기질소원은 peptone 등 7종, 아미노산은 asparagine 등 14종 그리고 유기산은 acetic acid 등 8종을 1%씩 첨가하였고, 무기염류는 KCl 등 13종을 1 mM 농도로 첨가한 배지[16] 9mL가 담긴 테스트튜브 상에 5반복씩 1ml 접종하였다. 접종한 균체를 진탕배양기(180 rpm)에서 7일간 암배양한 후 10배 희석법을 이용하여 10^5 배로 희석한 배양액 100 μ l를 PDA 평판배지상에 도말한 후, 25°C 항온배양기에서 7일간 배양하여 균총숫자를 집계하여 colony forming unit(CFU)/mL으로 나타내었다.

또한 선발된 각각의 성분들에 대한 최적 농도를 조사하기 위하여 PDA 평판배지에서 14일간 배양된 흰목이 균사체를 살균 증류수 100ml와 혼합한 후, 선발된 각각의 성분이 0.1%에서 4.0%까지(무기염류는 1~10mM) 농도로 조정된 배지 9mL가 담긴 테스트튜브 상에 5반복씩 1ml 접종하였다. 접종한 균체를 진탕배양기(180 rpm)에서 7일간 암배양한 후 10배 희석법을 이용하여 10^5 배로 희석한 배양

액 100 μ l를 PDA 평판배지상에 도말한 후, 25 $^{\circ}$ C 항온배양기에서 7일간 배양하여 균총숫자를 집계하여 colony forming unit(CFU)/mL으로 나타내었다.

결과 및 고찰

ITS 염기서열에 의한 유연관계 분석

수집한 흰목이의 유전적인 유연관계를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 흰목이균의 ITS 부위를 PCR 증폭하여 약 750bp의 유전자를 확보하였으며, 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열을 GenBank(NCBI)를 이용하여 상동성을 분석한 결과 *T. fuciformis*와 높은 유사성을 보였다. 또한 Neighbor Joining방법을 이용한 유연관계를 분석한 결과 흰목이는 *T. fuciformis*와 같은 그룹을 형성하였다(Fig. 1).

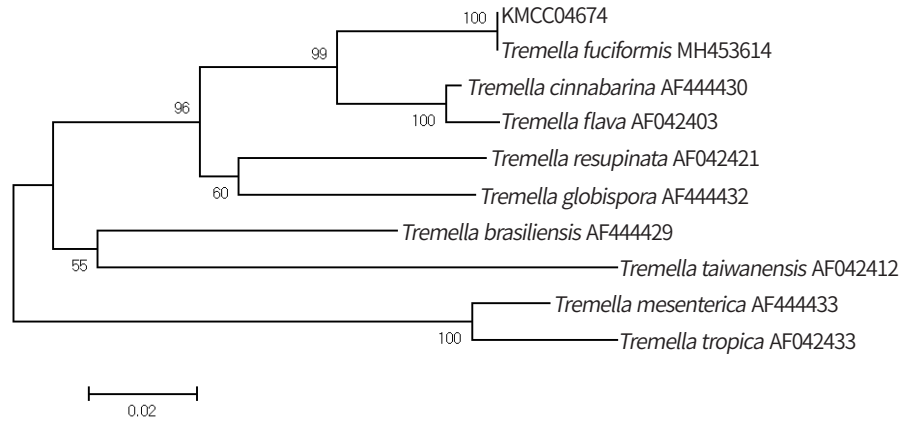


Fig. 1. Phylogenetic relationships of *T. fuciformis* based on internal transcribed spacer(ITS) sequences. Numerical values on branches are the bootstrap values as percentage of bootstrap replication from 1000 replicate analysis. Bar = 0.02 genetic distance between samples.

온도와 pH에 따른 균사배양 특성

흰목이를 15 $^{\circ}$ C에서 35 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C간격으로 생육정도를 조사한 결과 15 $^{\circ}$ C에서 25 $^{\circ}$ C까지 온도가 올라갈수록 생육 정도가 급격하게 증가하였으나, 25 $^{\circ}$ C 이상에서는 생육이 저하되었다. 결국 흰목이균은 25 $^{\circ}$ C에서 생육이 가장 좋았다(Fig. 2). 흰목이의 생육은 pH4 이하에서는 저해되었고 pH5에서 가장 좋았으며 그 이상에서는 완만하게 감소되었다. 따라서 최적생육 pH는 5.0인 것으로 확인되었다(Fig. 2). Chang 등[1]이 흰목이의 배양온도는 30 $^{\circ}$ C에서 생육이 좋았다는 보고와는 약간의 차이가 있었으며, Haung[4]이 25-26 $^{\circ}$ C범위에서 생육이 가장 좋았다는 보고와는 일치하였다. pH는 Chang 등[1]의 결과와 비슷한 산성일 때 생육이 좋은 것으로 나타났다.

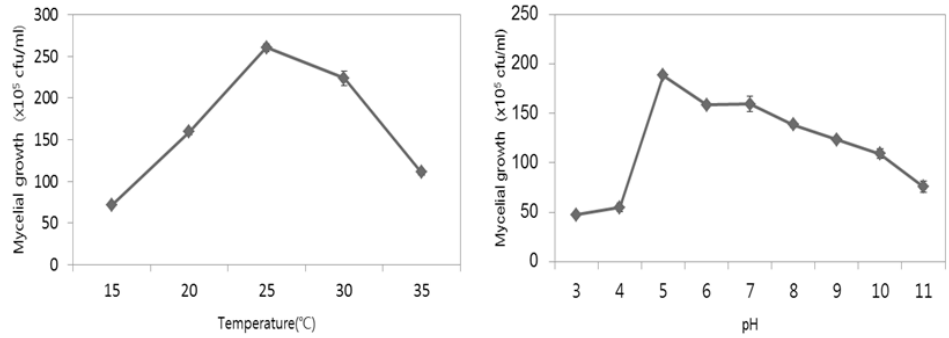


Fig. 2. Effect of temperature (n = 3; error bar = one standard deviation) and pH (n = 9; error bar = one standard deviation) on the growth of *T. fuciformis*.

영양원에 따른 균사배양 특성

탄소원으로 fructose 등 21종의 탄소원에 따른 흰목이의 생육은 비타민 B복합체의 일종인 inositol, 이당류인 lactose, 수용성 셀룰로오스인 Na-CMC, 비환원성 3당류인 raffinose에서는 거의 생육하지 못했으며, soluble starch와 당알코올인 mannitol에서 좋았고, 그중에 mannitol을 첨가한 배지에서 가장 높았다(Fig. 3). Mannitol의 농도를 높일수록 균 생육은 증가하였고, 4.0% 첨가한 배지에서 가장 좋았다(Fig. 4). Chang 등[1]은 환원성 2당류인 maltose에서 생육이 가장 좋았는 보고와는 차이가 있었다. Chang[1]은 모든 영양원 실험에서 고체배지를 이용한 플레이트에서 흰목이의 균사생장길이를 조사한 반면 본 실험에서는 흰목이를 액체배양한 후 균사밀도를 조사하였기 때문에 실험 방법의 차이로 다른 결과가 나왔을 것으로 판단되었다.

무기질소원으로 (NH₄)₂C₂O₄ 등 7종의 무기질소원에 따른 균의 생육을 조사한 결과, (NH₄)₂HPO₄

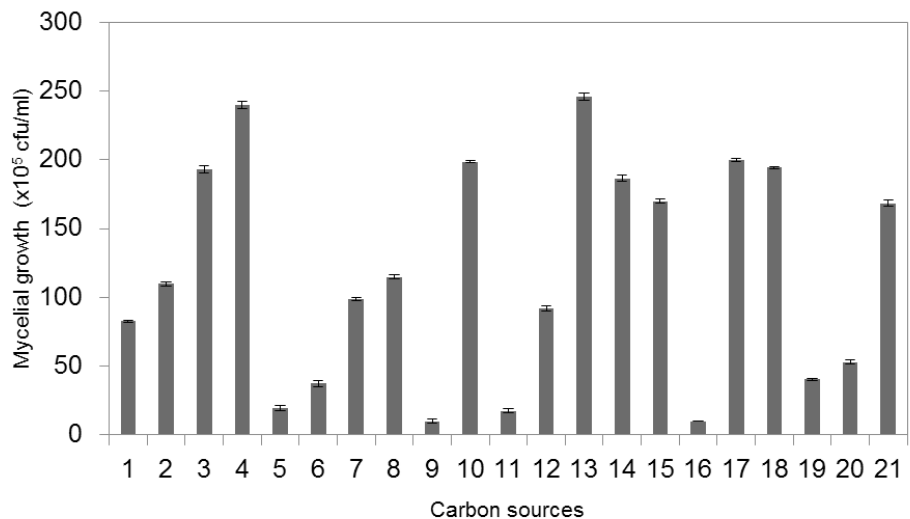


Fig. 3. Effect of carbon sources for the growth of *T. fuciformis* in basal medium. 1: Fructose, 2: Galactose, 3: Saccharose, 4: Soluble starch, 5: Inositol, 6: Glycerol, 7: Xylose, 8: Dextrose, 9: Lactose, 10: Dextrin, 11: Na-CMC, 12: Adonitol, 13: Mannitol, 14: Mannose, 15: Maltose, 16: Raffinose, 17: Cellobiose, 18: Ethanol, 19: Salicin, 20: Glucose, 21: Arabinose (n = 21; error bar = one standard deviation).

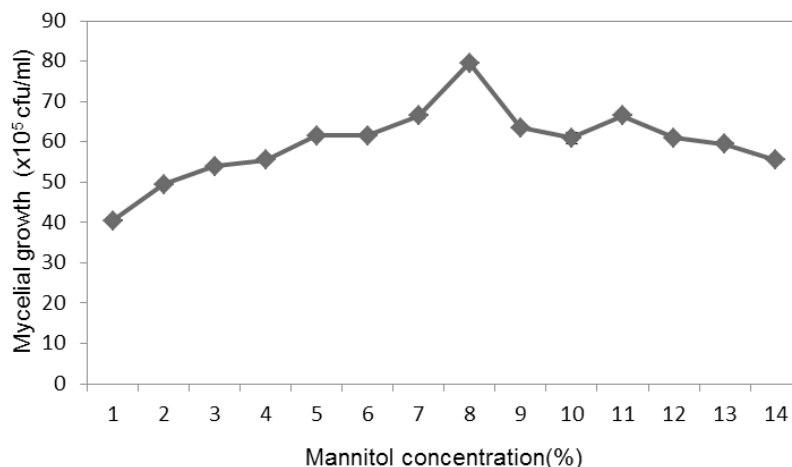


Fig. 4. Effect of mannitol concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 14; error bar = one standard deviation).

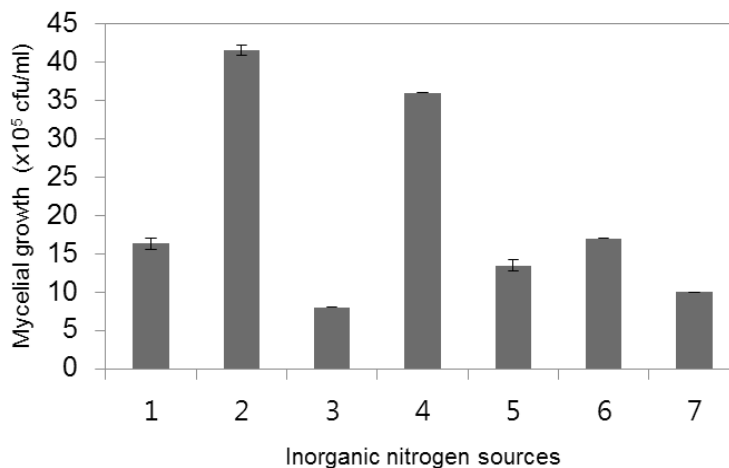


Fig. 5. Effect of inorganic nitrogen sources for the growth of *T. fuciformis* in basal medium. 1: (NH₄)₂C₂O₄, 2: NH₄H₂PO₄, 3: (NH₄)₂HPO₄, 4: NH₄NO₃, 5: NaNO₃, 6: (NH₄)₂SO₄, 7: (NH₄)₂C₄H₄O₆ (n = 7; error bar = one standard deviation).

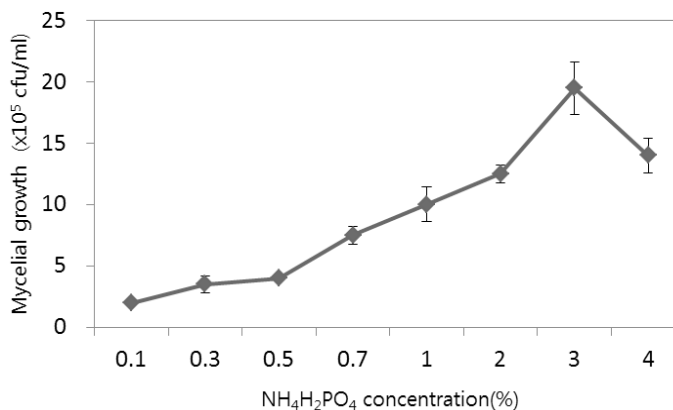


Fig. 6. Effect of NH₄H₂PO₄ concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 8; error bar = one standard deviation).

와 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 에서 생육이 가장 낮았고, NH_4NO_3 와 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 에서 생육이 좋았으며, 이들 중 균 생육이 가장 높았던 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 첨가한 배지를 선발하였다(Fig. 5). 최적농도를 선발하기 위하여 균 생육을 조사한 결과 처음에는 완만한 곡선을 그리다가 3.0%에서 급격한 성장을 했다. 따라서 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 를 3.0% 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 좋았다(Fig. 6). 흰목이 균사체의 생육이 암모니아태와 질산태질소의 형태에 영향을 받지 않는 것은 Chang[1]의 보고와 같았다.

유기질소원으로 선발하기 위해 peptone 등 7종 중에서 맥아 추출물인 malt extract에서 균 생육이 가장 높았다(Fig. 7). Malt extract의 최적농도는 1.0%였다(Fig. 8). Chang 등[1]의 연구에서 peptone에서 생육이 가장 좋았다는 보고와 차이가 있었다.

Alanine 등 14종 아미노산에 대하여 균주의 생육을 확인한 결과 필수 아미노산인 aspartic acid, 비필수 아미노산인 glutamic acid를 제외한 모든 첨가배지에서는 균이 잘 생육하지 못하였으며, glutamic acid를 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 좋았다(Fig. 9). Glutamic acid의 최적농도는 1.0% 였으며, 그 이상에서는 생육이 낮아졌다(Fig. 10). Chang[1]의 연구에서 alanine에서 생육이 좋았다는 보고와 차이

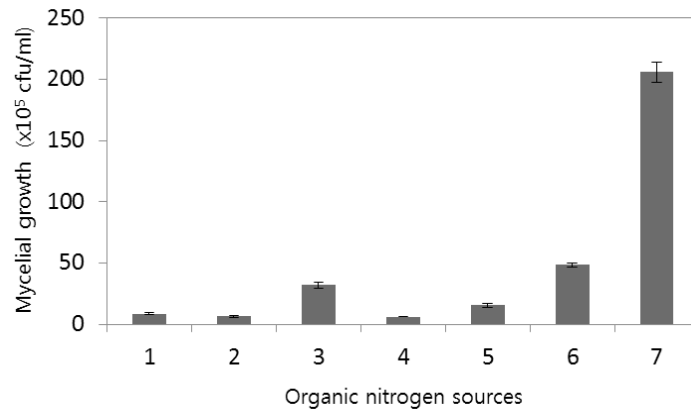


Fig. 7. Effect of organic nitrogen sources for the growth of *T. fuciformis* in basal medium. 1: Peptone, 2: Soytone 3: Urea, 4: Casamino acid 5: Tryptone, 6: Yeast extract, 7: Malt extract (n = 7; error bar = one standard deviation).

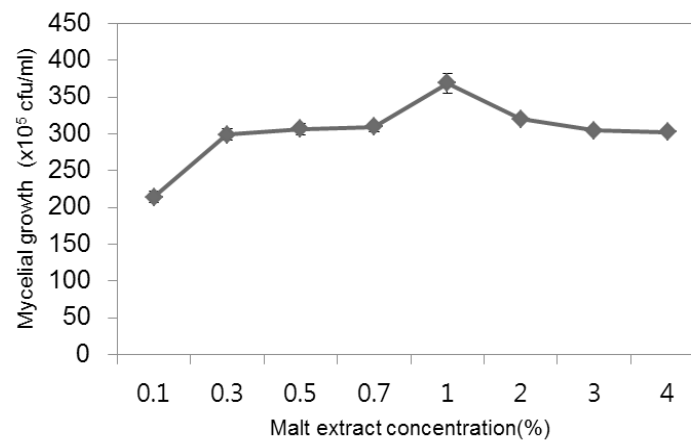


Fig. 8. Effect of Malt extract concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 8; error bar = one standard deviation).

가 있었다.

무기염류로는 KCl 등 13종 중에서 염화철 (FeCl₃), 염화코발트 (CoCl₂), 황산철 (FeSO₄), 질산은 (AgNO₃), 황산아연 (ZnSO₄)에서는 흰목이가 거의 생육하지 못했지만, 염화칼슘 (CaCl₂)을 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 높았다(Fig 11). CaCl₂의 최적농도는 5mM였다(Fig. 12).

유기산으로 acetic acid 등 8종에서 합성 카르복실산 acetic acid에서는 흰목이가 자라지 않았으며, 당 대사의 중간체이며 글루코오스의 산화에 의해 생긴 gluconic acid을 첨가한 배지에서 균 생육이 가장 높았다(Fig. 13). Gluconic acid의 최적농도는 0.5%였다(Fig. 14). Chang 등[1]의 연구에서 succinic acid에서 생육이 가장 좋았다는 보고와는 차이를 보였다.

이상의 결과, 흰목이의 최적 배양조건은 Table 2와 같다. 온도는 25°C, pH 5.0, 탄소원 4.0% mannitol,

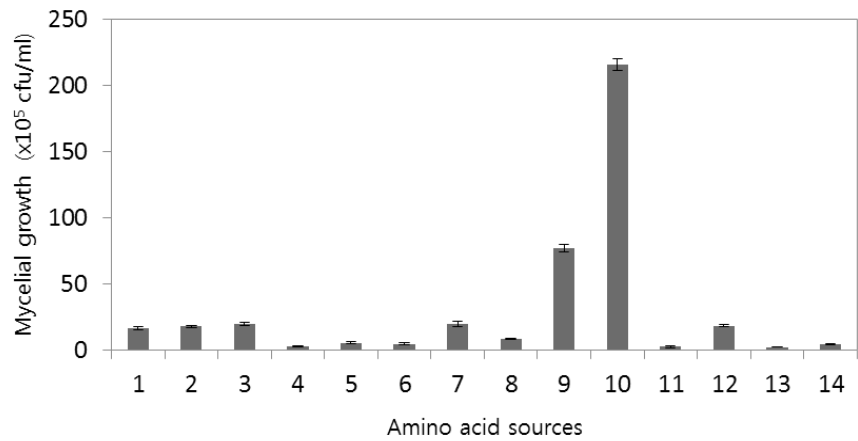


Fig. 9. Effect of amino acid sources for the growth of *T. fuciformis* in basal medium. 1: Alanine 2:Tyrosine, 3: Asparagine, 4: Methionine, 5: Proline, 6: Leucine, 7: Glutamine, 8: Valine, 9: Aspartic acid, 10: Glutamic acid, 11: Arginine, 12: Histidine, 13: Cysteine, 14: Threonine (n = 14; error bar = one standard deviation)

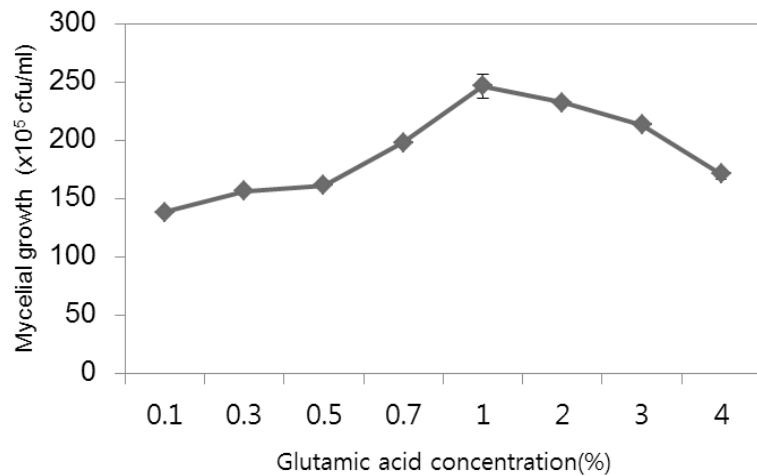


Fig. 10. Effect of Glutamic acid concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 8; error bar = one standard deviation).

유기질소원 1.0% malt extract, 무기질소원 3.0% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 아미노산 1.0% glutamic acid, 무기염류 5mM CaCl_2 , 그리고 유기산은 0.5% gluconic acid에서 생육이 가장 좋았다. 본 연구 결과에 따라 선발된 최적배양조건으로 흰목이를 배양한 후 도말하여 균체수를 측정된 결과, 대조군인 PDB배지보다 균체수가 적었다. 원인 중 하나로는 선발된 배지조성이 질소원의 농도가 과다하여 Chang[1]이 보고한 C/N ratio을인 20보다 낮게 되어 균의 성장을 저해하는 것으로 예상이 된다. 따라서 추후 흰목이 균사 배양에 적합한 C/N ratio에 대한 분석과 각각의 영양원에 대한 세밀한 실험을 통하여 흰목이 농가에 서 실용적으로 사용할 수 있는 최적의 균사생육조건을 설정하여야 될 것으로 판단되었다.

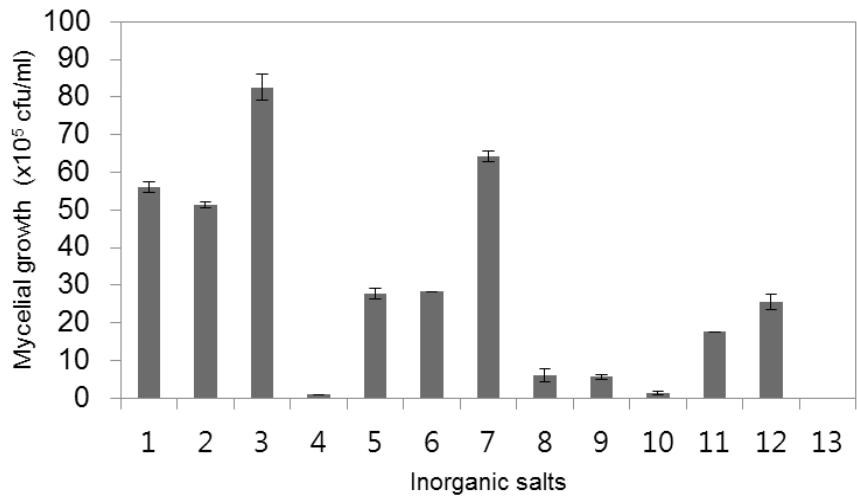


Fig. 11. Effect of inorganic salts for the growth *T. fuciformis* in basal medium. 1: KCl, 2: BaCl_2 , 3: CaCl_2 , 4: CoCl_2 , 5: Li_2SO_4 , 6: MnSO_4 , 7: MgSO_4 , 8: ZnSO_4 , 9: FeSO_4 , 10: AgNO_3 , 11: Na_2MoO_4 , 12: KH_2PO_4 , 13: FeCl_3 (n = 13; error bar = one standard deviation).

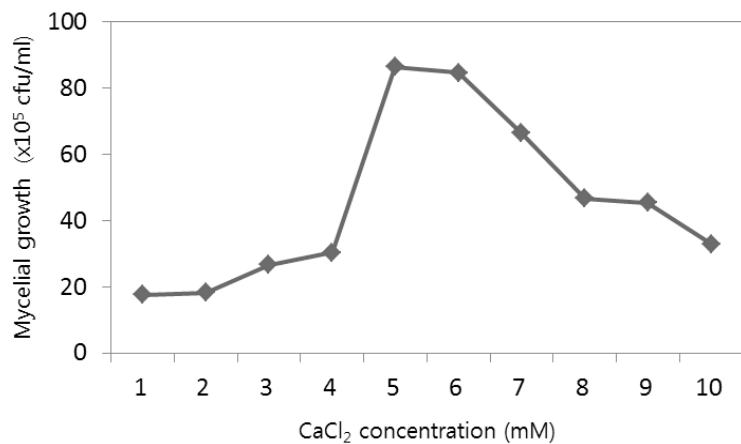


Fig. 12. Effect of CaCl_2 concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 10; error bar = one standard deviation).

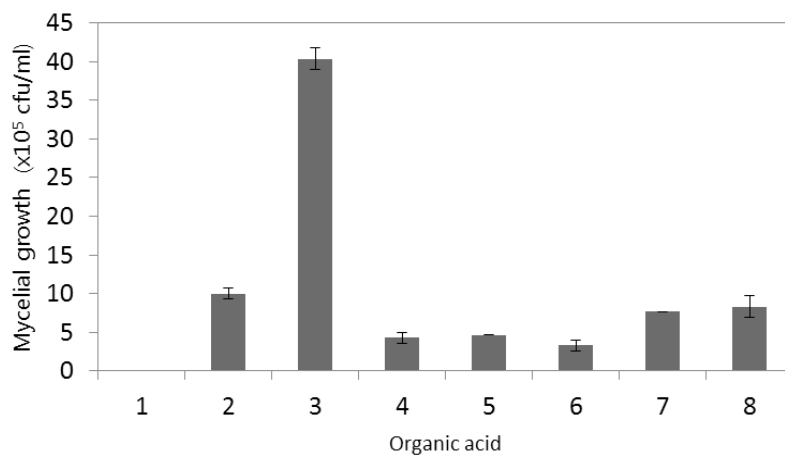


Fig. 13. Effect of organic acid for the growth *T. fuciformis* in basal medium. 1: Acetic acid, 2: Citric acid, 3: Gluconic acid, 4: Glutamic acid, 5: Lactic acid, 6: Maleic acid, 7: Propionic acid, 8: Succinic acid (n = 8; error bar = one standard deviation).

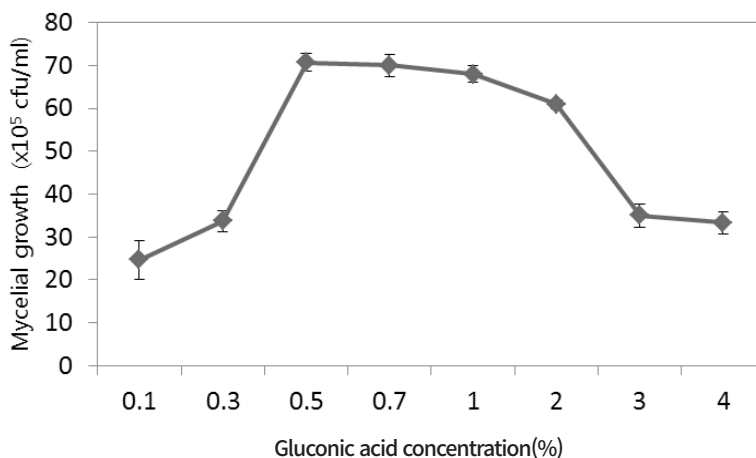


Fig. 14. Effect of gluconic acid concentration by *T. fuciformis* in basal medium (n = 8; error bar = one standard deviation).

Table 2. Culture condition of *T. fuciformis* for the maximal production of inhibition substance

	Carbon source	4.0% Mannitol
Optimal medium	Inorganic N-Source	3.0% NH ₄ H ₂ PO ₄
	Organic N-source	1.0% Malt extract
	Amino acid	1.0% Glutamic acid
	Inorganic salt	5mM CaCl ₂
	Organic acid	0.5% Gluconic acid
Induction temperature		25°C
Initial pH		5

적요

본 연구에서는 흰목이 균사배양을 위한 최적조건을 분석하였다. 흰목이균주(KMCC04674) 균사체의 대량배양에 효율적인 영양원 선발을 위하여 M9 기본배지에 탄소원 fructose 등 21종, 무기질소원 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 등 7종, 유기질소원 peptone 등 7종, 아미노산 asparagine 등 14종, 그리고 유기산 acetic acid 등 8종을 각각 1%씩 그리고, 무기염류 KCl 등 13종을 1 mM 농도로 첨가하여 각각에 대한 균사체의 생육을 조사하였다. 또한 선발된 영양성분들에 대한 최적 농도를 알기 위하여 0.1%에서 4.0%까지 배지에 첨가하고 배양 후 흰목이 균사체 생육정도를 조사하였다. 그 결과, 균사체의 대량배양을 위한 생육최적조건은 온도 25°C, pH5, 탄소원 4.0% mannitol, 유기질소원 1.0% malt extract, 무기질소원 3.0% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 아미노산 1.0% glutamic acid, 무기염류는 5mM CaCl_2 그리고 유기산 0.5% gluconic acid였다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant (PJ01269202) from the National Institute of Horticultural and Herbal Science, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Chang HY. Artificial cultivation of *Tremella fuciformis* Berk. using associated fungus, *Hypoxylon* sp. [dissertation]. Chuncheon, Korea: Kangwon National University; 1997.
2. Cheng HH, How WC, Lu ML. Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* Berk. edible mushroom in rats fed a high cholesterol diet with or without Nebacitin. *J Agric Food Chem* 2003;50:7438-43.
3. Choi SW, Chang HY, Yoon JW, Lee C. Optimization of artificial cultivation of *Tremella fuciformis* in closed culture bottle. *J Mushrooms* 2008;6:20-6.
4. Huang NL. Cultivation of *Tremella fuciformis* in Fujian, China. *Mushroom News! Trop* 1982;2:2-5.
5. Huang NL. Cultivation of *Tremella fuciformis* in China. 1st ed. Beijing: China Agricultural Publishing Company; 2000.
6. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules, Munro HN, editor. *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic Press; 1969. p. 21-132.
7. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547-9.
8. Kwon SY, Whang K, Lee SP. Anti-inflammatory effects and GABA production of old antler and *Auricularia auricula-judae* extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Preserv* 2017;24: 274-81.
9. Lee CJ, Moon JW, Yoo YM, Han JY, Cheong JC, Kong WS. Optimum cultivation conditions for mass production of antagonistic bacterium *Pseudomonas azotoformans* HC5 effective in antagonistic of brown blotch disease caused by *Pseudomonas tolaasii*. *J Mushrooms* 2015;13:97-102.
10. Luo XC. Review of studies on *Tremella fuciformis* in China. *Mycosystema* 2013;32:14-9.
11. Peng WH, Wang Y, Huang ZQ, Gan BC. The Present situation of *Tremella fuciformis* research

- and problems existed in China. *Acta Edulis Fungi* 2005;12
12. Cheung PCK. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricular* (tree ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly leaf) in hypocholesterolemic rats. *Nutr Res* 1996;16:1721-5
 13. Ryu YH, Yoon YS, Jo WS, Park SD, Choi BS, Kim JK. Effect of liquid spawn on *Flammulina veluipes* cultivation. *J Mycol* 1998;26:20-4.
 14. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
 15. Stanier, RY, Palleroni, NJ, Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *Microbiology* 1966;43:159-271.
 16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;11:4673-80.
 17. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.